SUI LIPOIDI DEI LEUCOCITI

per C. Ciaccio, assistente e libero docente di istologia patologica (Istituto di medicina operatoria della R. Università di Palermo).

S 298

Estratto da
FOLIA CLINICA CHIMICA ET MICROSCOPICA
Vol. II. - Fasc. V. - Gennaio 1910.

— Tipografia Adamo Mattioli —
Borgo San Donnino - Salsomaggiore

SUI LIPOIDI DEI LEUCOCITI per C. CIACCIO, assistente e libero docente di istologia patologica (Istituto di medicina operatoria della R. Università di Palermo).

È merito speeialmente di Cesaris-Demel (1) di avere attirato l'attenzione sul grasso dei leucociti circolanti in condizioni normali e patologiche. Questo autore si è servito a tale scopo di un metodo semplicissimo e cioé: si striscia sopra una lastra portaoggetti un sottile straterello di sudan in soluzione alcoolica e vi si sovrappone una lastrina coprioggetti colla gocciolina di sangue.

Per mezzo di tale metodo questo autore ha stabilito:

1. che in condizioni normali, specie i leucociti, possono contenere granulazioni adipose; ciò si verifica specialmente per i polinucleari neutrofili nella proporzione del 15 per cento;

2. in condizioni patologiche si possono riscontrare due varietà di leucociti contenenti grasso e cioé: *a)* leucociti con granulazioni di grasso più o meno abbondanti con le altre granulazioni ed il nucleo inalterato; *b)* leucociti con nucleo profondamente alterato e le altre granulazioni mancanti od alterate e con grosse e numerose gocciole di grasso.

La prima di queste varietà aumenta in svariati stati tossici; la seconda varietà (corpuscoli purulenti) si riscontrerebbe nel sangue, in scarso numero specialmente quando

(1) CESARIS-DEMEL. - R. Accad. delle scienze di Torino. Febb. 1908.
Id. - R. Accad. di med. di Torino. - Maggio 1909.
Id. - Riv. di microscopia e chimica clinica. - 1909.
" - Pathologica. - Anno I, n, 19.

esistono raccolte purulente circoscritte. Si comprenderà facilmente come tali ricerche per la semplicità del metodo e per la grande importanza che esse possano avere dal punto di vista diagnostico, avessero attirato l'attenzione dei clinici.

Mi dispenso in questa nota di entrare in dettagli bibliografici: dirò in generale che col metodo di Cesaris-Demel furono istituite da parecchi autori italiani delle ricerche in svariate condizioni patologiche. La maggior parte di questi autori conferma i risultati di Cesaris-Demel; alcuni però dissentono più o meno dalle sue interpretazioni. Così, per esempio: secondo alcuni la seconda varietà di leucociti (corpuscoli purulenti) potrebbe mancare in casi di ascessi circoscritti e trovarsi invece in stati tossici ed infettivi. Alcuni autori poi hanno istituito anche delle ricerche sperimentali: a tale proposito ricordo le ricerche di Jousset e Troisier (1) e quelle recentissime di Tommasi-Crudeli (2).

I primi hanno portato una variante al metodo di Cesaris-Demel: essi raccolgono il sangue in soluzione tiepida di citrato di soda all' $1^1/_2$ %; centrifugano e asportato lo strato biancastro superiore aggiungono una goccia di soluzione di bleu di metilene: dopo di che seguono il procedimento di Cesaris-Demel.

Da ricerche condotte con tale metodo gli autori giungono alle seguenti conclusioni:

1. i globuli lipofori rappresentano il 10-50 per cento dei leucociti per lo più neutrofili, spesso anche i grossi mononucleati e gli eosinofili raramente nelle martzellen; i medii mononucleati ed i linfociti sono privi di grasso;

2. nessuna influenza hanno i pasti ricchi di grasso ed il digiuno;

3. concludono infine che i globuli lipofori sono un costituente normale del sangue e non già l'espressione di un fatto degenerativo.

(1) Jousset et Troisier. - C. r. de la Soc. de biol. de Paris. - 1907.
(2) Tommasi-Crudeli. - Congr. ital. di patol. - Palermo 1908.

Tommasi-Crudeli ha istituito una doppia serie di ricerche sperimentali: in una prima studia il modo di comportarsi del grasso nell'intossicazione fosforica: in una seconda il potere fagocitario dei leucociti verso sostanze grasse iniettate. Da queste ricerche egli così conclude:

« Che si possa parlare di degenerazione dei leucociti « soltanto nelle più gravi intossicazioni, agenti per via « ematogena, le quali, come nella fosforica acuta, possano « determinare alterazioni profonde ed estese di tutti i leu- « cociti; che al reperto di leucociti, carichi di gocce di « grasso si debba dare significato più vasto di indicatore « di un processo di riassorbimento che avviene in seno « all'organismo; che non si possa, infine, da esso reperto « trarre alcun fatto veramente specifico per la esistenza « o meno di un fatto suppurativo da cui tale processo di « riassorbimento trae la sua origine. »

Recentissimamente Donzello (1), in base a ricerche cliniche, conferma l'opinione della maggior parte dei ricercatori, sostenendo la grande importanza diagnostica per un processo suppurativo dei leucociti contenenti numerose gocciole di grasso.

D'altra parte questo autore ha riscontrato la stessa varietà di leucociti lipofori in infermi ai quali era stato iniettato olio iodato.

Data questa ultima osservazione non si comprende come Donzello possa attribuire un valore diagnostico specifico ai leucociti cosidetti purulenti.

***

Io credo che, prima di stabilire il possibile valore diagnostico dei leucociti lipofori in genere, dimostrabili col metodo di Cesaris-Demel, sia necessario indagare il meccanismo biologico e fisico-chimico del metodo in parola.

Dalle ricerche di Pfeiffer (2) e specialmente di Overton (3) risulta che le colorazioni vitali son dovute quasi

(1) Donzello. - L'Ospedale di Palermo, 1909.
(2) Pfeffer. - Citato da Rossi. Archiv. di fisiologia. - Maggio 1908.
(3) Overton. - Studien über die Narkose. - Fischer, Jena, 1901.

esclusivamente ai colori basici di anilina: questo ultimo autore istituendo delle ricerche con sostanze coloranti basiche, dotate di scarso potere tossico, ha visto che si può ottenere in vita la penetrazione di queste in alcune cellule. La sostanza colorante in questi casi si distribuise in alcuni granuli protoplasmici, mentre il nucleo e la sostanza intercellulare rimangono incolori.

Questi fatti possono avere una spiegazione, ammettendo la teoria di Overton: secondo questo autore le cellule sarebbero circondate da uno strato lipoide, costituito da lecitina e da colesterina: sicché, dato ciò, nelle cellule penetrerebbero appunto le sostanze solubili nei lipoidi. Ora, secondo Overton, le sostanze coloranti basiche sarebbero solubili nei lipoidi.

La dottrina di Overton viene appoggiata anche dalle ricerche di Schmidt (1), il quale osservò che il bleu di metilene nelle cellule intestinali viventi si raccoglie in granuli che per distribuzione somigliano a quelli nei quali si raccoglie il grasso durante l'assorbimento intestinale.

Possiamo noi invocare questa teoria per spiegare la colorazione del grasso dei leucociti per mezzo del sudan?

Ciò é possibile, ma bisogna notare che la teoria di Overton è stata combattuta da parecchi autori. Specialmente Traube (2) spiega la penetrazione nelle cellule di sostanze solubili nei lipoidi con un meccanismo differente: egli cioé crede che queste penetrano nelle cellule perchê abbassano la tensione superficiale.

Io credo che la penetrazione di alcune sostanze coloranti, come il bleu di metilene, il rosso-neutro, il brillant-cresylblau nelle cellule non sia un argomento valido per avvalorare la dottrina di Overton, perchè tali sostanze, oltre che nei lipoidi, sono solubilissime anche in altri mezzi e specialmente nell'acqua. Esperienze da me isti-

(1) Schmid. - Plüger's Archiv. - 1909.
(2) Traubet. - Ib.dem. - 1904.

tuite in proposito mi porterebbero a conclusioni differenti: infatti, sperimentando su miscugli di globulina e di lecitina, si nota che le sostanze coloranti basiche, che comunemente si adoperano per le colorazioni vitali, si distribuiscono in quantità maggiore sulle prime anziché sulle seconde: colorando, ad esempio, col rosso neutro, si vede che mentre le gocciole di lecitina assumono una tinta rosea, la proteina assume una tinta rossa più o meno intensa. D'altro canto bisogna tener conto di un altro fattore e cioè della reazione acida o basica.

Un grande valore, invece, secondo me, potrebbero avere ricerche istituite sulla permeabilità delle cellule per le sostanze coloranti solubili nei grassi e non in mezzi acquosi, come il sudan, lo scharlach, ecc.. In questi casi da ricerche che qui non è il caso di esporre dettagliatamente, mi risulta appunto che queste sostanze sospese in soluzioni di Na Cl non penetrano nella maggior parte delle cellule sia animali che vegetali: penetrano solo ed in date condizioni negli elementi dotati di movimento (leucociti, protozoi) oppure in elementi cellulari che eventualmente sono avvolti da uno strato cereo (alcuni microrganismi od alcune cellule vegetali) o contengono goccioline lipoidi nel loro strato ectoplasmico.

Date queste considerazioni la colorazione del grasso contenuto nei leucociti viventi può avere una logica spiegazione senza dover ricorrere all'ipotesi di Overton.

Io credo infatti che ciò possa spiegarsi col potere fagocitario dei leucociti almeno in parte ed in questo caso il risultato della colorazione col Sudan avrebbe lo stesso valore dell'indice opsonico; i granuli coloranti inglobati dai leucociti si scioglierebbero nelle sostanze grasse da questi contenute.

Ciò può spiegare perchè per la buona riuscita dei preparati sia necessaria una certa temperatura (Cesaris-Demel); come d'altro canto si spiegano anche i risultati sopra esposti di Jousset e Troisier, i quali si sono serviti

di una tecnica simile a quella che si pratica per la valutazione dell' indice opsonico

Ricerche che io ho istituito in proposito appoggiano questo mio modo di vedere.

Se si raccoglie il sangue in una soluzione isotonica di cloruro di sodio e citrato di sodio, i risultati sono variabili a seconda della temperatura alla quale é sottoposta la preparazione. Negli animali a sangue freddo (rana, lucertola) si ottengono ottimi risultati anche alla temperatura di 15°, mentre nei mammiferi i migliori risultati si ottengono alla temperatura di 37°; quanto più bassa è questa temperatura tanto minore é il numero di leucociti lipofori dimostrabili con tale processo.

Mi si potrebbe obbiettare che alcuni leucoeiti profondamente degenerati si lasciano penetrare dal Sudan: in questo caso però non si può escludere che le gocciole adipose arrivino fino alla superficie esterna dei leucociti, e quindi il fatto si spiega benissimo.

Senza però volere essere esclusivo, io credo che almeno uno dei meccanismi, secondo cui si verifica la colorazione dei granuli grassosi dei leucociti sia dovuto alla proprietà fagocitaria di qnesti.

Date queste considerazioni non si può dunque escludere che il metodo adoperato da Cesaris-Demel sia un procedimento legato alle condizioni biologiche e fisicochimiche dei leucociti. Sicché si comprende facilmente come i risultati debbano essere variabili a seconda di condizioni speciali in parte valutabili, ma che in parte sfuggono alla nostra analisi.

Per ottenere quindi risultati attendibili. specie per le ricerche cliniche, consiglierei di controllare i risultati ottenuti col metodo di Cesaris-Demel con altri metodi in uso per la dimostrazione del grasso.

Dopo parecchi tentativi io ho trovato che risultati soddisfacenti si ottengono coi miei metodi per la dimostrazione dei lipoidi, leggermente modificati.

Quindi io consiglierei i due metodi seguenti;

I METODO.

a) fissazione del sangue strisciato su lastrine coprioggetti per qualche minuto ai vapori di formalina;

b) immersione per 12 ore delle lastrine in liquido di Ciaccio (formol-cromo-formico);

c) cromizzazione per 24 ore (soluz. di bicromato di potassa al 3 per cento);

d) lavaggio in acqua corrente;

e) passaggio in alcool a 70°;

f) colorazione con Sudan III-Emateina; inclusione in gomma-sciroppo.

Con tale procedimento si colorano sia i grassi comuni che i lipoidi: per colorare solo questi ultimi: prima di colorare col Sudan le lastrine si passano nei soliti solventi dei grassi; alcool assoluto, xilolo per mezz'ora od un'ora e quindi serie degli alcools e colorazione come sopra.

II METODO.

a) fissazione nella seguente miscela per 12 ore:

Acido osmico all'1 per cento	cc. 10
Bicromato di potassa al 5 per cento.	cc. 15
Acido formico puro.	1 goccia

b) lavaggio in acqua corrente per due ore;

c) alcool a 70°; Sudan III ed Emateina; inclusione in gomma - sciroppo.

Quest'ultimo metodo credo sia preferibile al primo per il risparmio di tempo e perché dá risultati completi.

Con esso si differenziano due varietà di grasso di cui una assume una tinta nera e l'altra una tinta bruna che sotto l' influenza del Sudan diventa rosso-bruna.

Senza insistere sul significato di questi dati istochimici, che io ho già ampiamente esposto in altri lavori, dirò qui semplicemeute che il grasso messo in evidenza col primo metodo e quello colorabile dal Sudan nel secondo metodo deve considerarsi come un lipoide (lecitina).

***

Coll'applicazione dei metodi suesposti in condizioni normali si hanno i seguenti risultati:

1. i linfociti e le mastzellen non contengono sostanze grasse;

2. i grossi mononucleati, specie col primo metodo, presentano un endoplasma colorato in orange diffuso e spesso dei granuli più o meno grossi di natura lipoide;

3. per quanto riguarda i polinucleati, quelli a granuli neutrofili, rispettivamente anfofili (coniglio-cavia) presentano quasi tutti dei granuli e delle goccioline lipoidi in quantità variabili: un certo numero di tali leucociti presenta poi delle goccioline in numero di 6-10 e certe volte anche più, della grandezza di 1 μ circa.

Nei leucociti a granuli acidofili in alcuni casi ed in alcuni animali, le granulazioni assumono una tinta orange più o meno intensa: inoltre tra le granulazioni qualche volta si notano granuli e goccioline decisamente lipoidi.

Nelle mastzellen non si notano sostanze grasse.

Durante la digestione non si notano differenze notevoli; pare che ci sia solo un lieve aumento dei lipoidi; inoltre in alcuni animali, come nel cane, spesso i polinucleari neutrofili contengono delle gocciole che col metodo II appaiono di colorito nero.

Nelle infezioni ed intossicazioni sia sperimentali che umane, i lipoidi aumentano in tutte le varietà; inoltre aumentano di numero i leucociti contenenti parecchie gocciole lipoidi e che sopra ho accennato.

Finalmente, in alcuni casi patologici si possono riscontrare dei leucociti a nucleo profondamente degenerato ed a protoplasma pieno di grosse gocciole lipoidi. Questi che verosimilmente corrispondono ai corpuscoli purulenti di Cesaris-Demel ho riscontrato in scarso numero in due casi di pulmonite crupale, in casi di infezione difterica nei conigli, in due casi di appendicite suppurata, in un caso di malaria a tipo estivo-autunnale.

Qnale é il significato che bisogna attribuire ai lipoidi dei leucociti?

Le mie ricerche sulla fisio-patologia dei tessuti emopoietici (1) hanno messo in luce, credo con sufficiente chiarezza, il metabolismo dei lipoidi leucocitari.

Nel midollo osseo si assiste alla penetrazione di lipoidi (elaborati dalle cellule adipose e lecitiniche) nei mielociti e che pare servano in parte come materiale di costruzione per le granulazioni protoplasmatiche. Alcune di queste goccioline lipoidi rimangono libere e persistono nei polinucleari che passano nella corrente sanguigna.

Ciò dunque è quanto si verifica nelle fasi iniziali del metabolismo lipoide: vediamo ora le fasi finali.

Queste si compiono nei tessuti linfoidi e nel tessuto adenoide dell'intestino: i polinucleati e specialmente gli acidofili in questi si presentano riempiti di granulazioni lipoidi ed in tale fase presentano gravi alterazioni nucleari e sono fagocitati dai macrofagi.

Tale dunque è il ciclo vitale dei leucociti!

Da questa breve esposizione si deduce che uel sangue possono riscontrarsi principalmente due varietà di leucociti, per quanto riguarda il metabolismo lipoide:

1. in una varietà i lipoidi sono l'esponente della attività cellulare;

2. in un'altra varietà i lipoidi sono l'esponente di un fatto degenerativo ed in tal caso i leucociti vanno a compiere il loro ciclo vitale nei tessuti linfoidi; tali elementi da me sono considerati come affetti da *degenerazione lecitinica* più o meno avanzata.

Le due forme si differenziano tra loro per i caratteri del nucleo e delle granulazioni protoplasmatiche.

Si può ammettere che nella seconda varietà il lipoide si trovi nel protoplasma per un processo di fagocitosi?

In alcuni casi forse ciò é possibile, ma io credo che nella maggioraza dei casi i lipoidi originino in situ per

(1) Ciaccio. - Folia hämatologlca - Bd. VIII-IX, 1909.
Id. - Cenh. f. allg. Path. u. Path. Anat. - 1909.
Id. - Anat. Anzeiger. - 1909.

un processo di sdoppiamento dei lipo-proteidi che costituiscono le granulazioni protoplasmatiche. Questa ipotesi è appoggiata dai seguenti fatti:

1. dallo studio del ciclo vitale dei leucociti, seguiti dalla culla (tessuti mieloidi) alla tomba (tessuti linfoidi);

2. da ricerche istituite sui leucociti in autolisi. In questi casi si nota che in un primo tempo i lipoidi dei leucociti aumentano notevolmente, mentre le granulazioni protoplasmatiche diminuiscono fino a scomparire.

Credo d'aver tracciato in modo sufficientemente chiaro il metabolismo dei lipoidi dei leucociti: ognuno vede quanto esso sia complesso e come prima di applicare alcuni dati scientifici alla clinica sia necessario di vagliare bene i fatti.

Io credo che il metodo di Cesaris-Demel sia un metodo prezioso, ma perchè esso possa riuscire utile per le indagini cliniche é necessario:

1. mettersi in condizioni sempre eguali e costanti;
2. istituire dei metodi di controllo;
3. è assolutamente necessaria una certa competenza in ematologia, la quale è una branca più difficile di quello che si crede e che certamente non si può improvvisare.

Giunto alla redazione il 16 novembre 1909.

FOLIA CLINICA
Chimica et Microscopica

Direttore Onorario: A. RIVA

Pubblicazione internazionale centrale per la letteratura medica che tratta delle indagini di laboratorio nei loro rapporti colla clinica (chimica, chimico-fisica, microscopia, batteriologia, prove biologiche, etc.)

Diretta da L. ZOJA - Redatta da A. FERRATA
della R. Università di Parma
colla collaborazione di Colleghi delle varie Nazioni.

IL GIORNALE PUBBLICA:

LAVORI ORIGINALI (con tabelle, figure nel testo, tavole colorate, ecc.) e RIVISTE SINTETICHE compilate per i vari argomenti da Autori più particolarmente competenti in ciascuno di essi.

SUNTI e RIVISTE della letteratura che riguarda la chimica e la microscopia clinica, stesi da redattori appositamente incaricati per le rispettive nazioni.

Dodici fascicoli annui formano un Volume di circa 500 pagine

Abbonamento annuo: Italia L. 20,00 - Estero L. 25,00

Per la Redazione rivolgersi: L. ZOJA - Via Farini, 123, PARMA
A. FERRATA, Clinica Med., PARMA

Per l'Amministrazione:
SOCIETÀ EDITRICE MEDICA - PONTEVICO, (Brescia).

Esclusivo concessionario per l'Estero:
Dr. WERNER KLINKHARDT - Liebigstrasse, 2, LEIPZIG.